

Penentuan total *Vibrio* spp. dalam media budidaya ikan - Metode tuang sebar



© BSN 2013

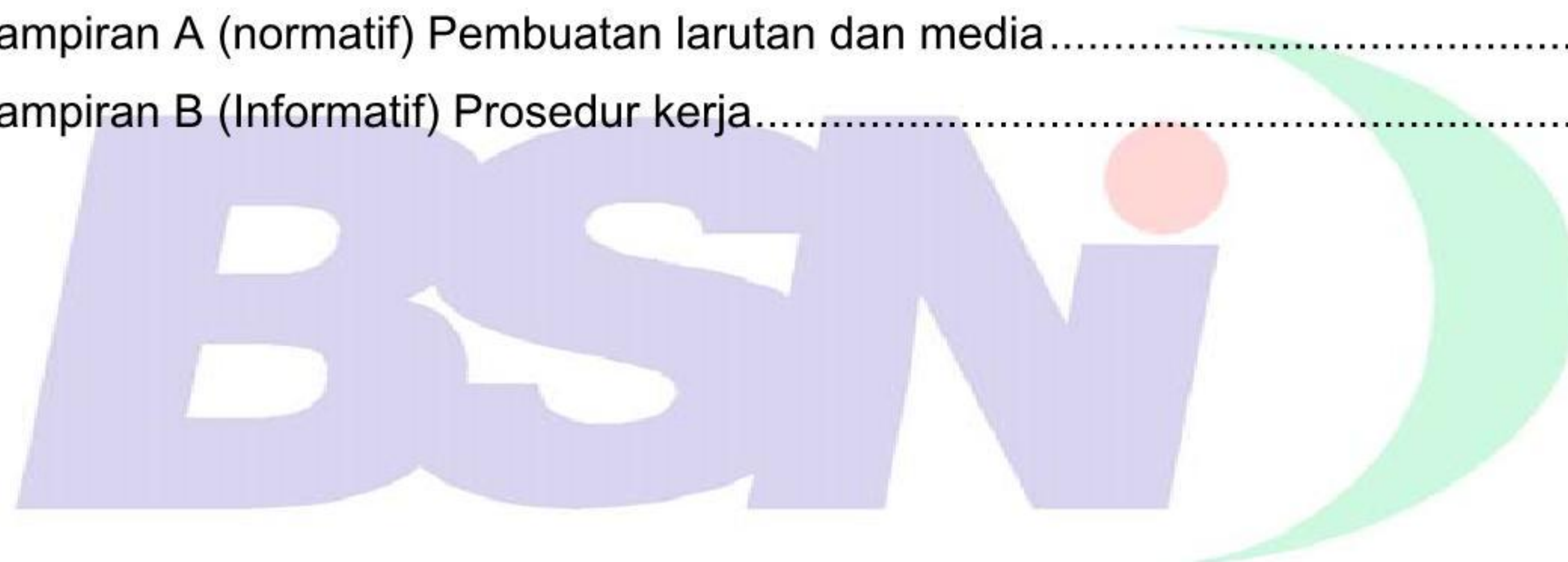
Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan Definisi	1
3 Prinsip.....	1
4 Peralatan	1
5 Bahan	2
6 Prosedur kerja	2
7 Interpretasi hasil/perhitungan	2
8 Pelaporan	4
9 Jaminan dan pengendalian mutu	4
Lampiran A (normatif) Pembuatan larutan dan media.....	5
Lampiran B (Informatif) Prosedur kerja.....	6



Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan budidaya serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Penentuan total *Vibrio* spp. dalam media budidaya ikan - Metode tuang sebar.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya, dan telah dibahas melalui rapat teknis serta terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 23 November 2012 di Bogor, yang dihadiri oleh unsur pemerintah, produsen, konsumen, pembudidaya, perguruan tinggi, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya dengan memperhatikan:

1. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan No. PER.19/MEN/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan No. KEP.02/MEN/2007 tentang. Cara Budidaya Ikan Yang Baik (CBIB)
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan No. KEP.01/MEN/2007 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Pada Proses Produksi, Pengolahan dan Distribusi.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 11 Maret 2013 sampai 10 Mei 2013 dengan hasil akhir RASNI.

Penentuan total *Vibrio* spp. dalam media budidaya ikan - Metode tuang sebar

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan prosedur penghitungan total bakteri *Vibrio* spp. dalam media budidaya ikan dengan menggunakan metode pengenceran bertingkat dan penanaman sebar.

2 Istilah dan Definisi

Untuk tujuan penggunaan dalam dokumen ini, istilah dan definisi berikut ini digunakan.

2.1

colony forming unit (CFU)

satuan jumlah sel bakteri yang membentuk koloni

2.2

colony counter

alat yang digunakan untuk menghitung koloni bakteri yang tumbuh dalam media agar

2.3

duplo

pengujian dilakukan dua ulangan

2.4

inkubasi

pengkondisian mikroorganisma untuk tumbuh dan berkembang biak sesuai suhu dan waktu yang diperlukan

2.5

koloni

kumpulan sel mikroba yang tumbuh pada media agar dan dapat dilihat secara visual

2.6

media agar selektif

media padat yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri tertentu

2.7

spreader

koloni bakteri yang tidak menyebar dengan sempurna

3 Prinsip

Penghitungan total bakteri *Vibrio* spp. dalam media budidaya ikan payau dan laut dengan metode pengenceran bertingkat dan penanaman sebar pada media selektif.

4 Peralatan

a) *autoclave*;

- b) batang penyebar (*spreader*);
- c) bunsen;
- d) cawan petri;
- e) *colony counter*;
- f) *hot plate stirrer*;
- g) incubator;
- h) *laminary air flow*;
- i) mikropipet 1.000 µl, 100 µl;
- j) *mini mixer*;
- k) *pipetor* 1 ml - 10 ml/pipet ukur 10 ml;
- l) *refrigerator*.
- m) tabung reaksi.

5 Bahan

- a) akuades *thiosulphate*;
- b) alkohol 70%;
- c) *Citrate Bile Salt Sucrose Agar* (TCBSA);
- d) *microtip* 200 µl, 1.000 µl;
- e) NaCl;
- f) MgSO₄;
- g) KCl.

6 Prosedur kerja

- a) siapkan tabung berisi 9 ml larutan *trisalt* steril (Lampiran A) sesuai kebutuhan;
- b) masukkan 1 ml contoh air uji ke dalam tabung yang berisi 9 ml larutan *trisalt* steril dan homogenkan dengan *minimixer* untuk mendapatkan pengenceran 10x.
- c) ambil 1 ml dari poin b ke dalam tabung yang berisi 9 ml larutan *trisalt* steril dan homogenkan untuk mendapatkan pengenceran 100x, lakukan hingga pengenceran yang diinginkan.
- d) ambil 100 µl dari masing-masing pengenceran, inokulasikan pada permukaan media TCBSA dan ratakan dengan batang sebar;
- e) lakukan inokulasi secara *duplo* pada setiap seri pengenceran;
- f) inkubasikan selama 18 jam ± 2 jam pada 28 °C – 30 °C dengan posisi cawan terbalik;
- g) hitung koloni dari cawan-cawan yang mempunyai jumlah koloni 25 koloni – 250 koloni dengan *Colony Counter*.

7 Interpretasi hasil/perhitungan

Untuk melaporkan suatu hasil analisa mikrobiologi digunakan suatu standar yang menjelaskan mengenai cara menghitung koloni pada cawan serta cara memilih data yang ada untuk menghitung jumlah koloni di dalam suatu contoh sebagai berikut :

- a. Cawan yang mengandung jumlah 25 koloni – 250 koloni dan tersebar merata

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (d)}$$

Keterangan :

N adalah total koloni, dinyatakan dalam koloni per ml (CFU/ml);
 $\sum C$ adalah koloni pada semua cawan yang dihitung;

n_1 adalah jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 adalah jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung;
 d adalah pengenceran pertama yang dihitung.

contoh :

Pengenceran	:	1 : 100	1 : 1000
Jumlahkoloni	:	232 dan 244	33 dan 28

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (d)}$$

$$N = \frac{(232 + 244 + 33 + 28)}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2)] \times 10^{-1}}$$

$$= \frac{537}{0,022}$$

$$= 24.409$$

$$= 2,4 \times 10^4 \text{ CFU/ml}$$

- b. Cawan dengan jumlah koloni lebih besar dari 250
 Bila jumlah koloni per cawan lebih besar dari 250 pada seluruh pengenceran maka laporkan hasilnya sebagai terlalu banyak untuk dihitung (TBUD), tetapi jika salah satu pengenceran mempunyai jumlah koloni paling mendekati 250 laporkan sebagai Total *Vibrio* spp..

contoh :

Pengenceran	:	1 : 100	1 : 1000
Jumlah koloni	:	TBUD	640
Perkiraan Total <i>Vibrio</i> spp.	=	$6,4 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$	

- c. *Spreader*
Spreader dibedakan menjadi 3 tipe :
1. rantai koloni, antara koloni saling menyambung yang disebabkan karena bakteri yang saling mengelompok;
 2. *Spreader* berasal dari lapisan air antara agar dan dasar cawan;
 3. *Spreader* berasal dari lapisan air pada sisi/pinggir cawan atau pada permukaan agar;
 Jika cawan ditumbuhi *spreader* lebih besar dari 25% maka laporkan sebagai *spreader*:
 - *Spreader* tipe 1, jika hanya ada 1 rantai maka nyatakan sebagai 1 koloni;
 - jika 1 atau lebih rantai terlihat berasal dari sumber yang berbeda, laporkan masing-masing sumber sebagai 1 koloni;
 - *Spreader* tipe 2 dan 3 umumnya berasal dari koloni yang berbeda dan laporkan masing-masing sebagai 1 koloni.
 4. Jumlahkan *spreader* dan koloni untuk menghitung Total *Vibrio* spp.).
- d. Jumlah koloni semua cawan kurang dari 25 koloni atau cawan tanpa koloni.
 Bila pada kedua pengenceran yang digunakan diperoleh jumlah koloni kurang dari 25, catat koloni yang ada, tetapi nyatakan perhitungan sebagai kurang dari 25 dan dikalikan dengan $1/d$, dimana d adalah faktor pengenceran pertama yang digunakan dan dilaporkan sebagai perkiraan Total *Vibrio* spp.

contoh :

Pengenceran	:	1 : 100	1 : 1000
-------------	---	---------	----------

Jumlah koloni : 18 dan 0 2 dan 0
 Perkiraan Total *Vibrio* spp. lebih kecil dari $2,5 \times 10^4$ CFU/ml.

8 Pelaporan

- untuk menghasilkan perhitungan yang akurat dan teliti, maka laporkan hasilnya dengan dua angka (digit) pertama sebagai hasil pembulatan.
- bulatkan ke atas dengan cara menaikkan angka kedua menjadi angka yang lebih tinggi bila angka ketiga adalah 6, 7, 8 atau 9 dan gunakan angka 0 untuk masing-masing angka pada digit berikutnya.
- bulatkan kebawah bila angka ketiga adalah 1, 2, 3 atau 4. Bila angka ketiga adalah 5 bulatkan ke atas dengan keterangan bila angka kedua ganjil maka bulatkan keatas dan bila angka kedua genap maka bulatkan ke bawah.

contoh:

Hasil perhitungan Total *Vibrio* spp.

12.700	13.000
12.400	12.000
15.500	16.000
14.500	14.000

- beri tanda (*) untuk cawan yang berisi kurang dari 25 koloni.

contoh :

Pengenceran : 1 : 100 1 : 1000

Jumlah koloni : 18 dan 0 2 dan 0

Perkiraan Total *Vibrio* spp. lebih kecil dari $2,5 \times 10^4$ * CFU/ml

- jika seluruh cawan berisi *spreader* atau cawan terkontaminasi oleh sesuatu yang tidak diketahui, maka laporkan hasilnya sebagai "Kegagalan dalam pengujian".

9 Jaminan dan pengendalian mutu

- a) pengujian dilakukan segera setelah contoh uji diterima.
- b) setiap tahapan analisa dilakukan secara aseptis.
- c) media yang sudah digunakan disterilkan terlebih dahulu sebelum dibuang

Lampiran A
(normatif)
Pembuatan larutan dan media

A.1 Pembuatan larutan 100 ml Trisalt

- a) timbang 0,075 g KCl.
- b) timbang 0,694 g MgSO₄.
- c) timbang 1,84 g NaCl.
- d) campurkan semua bahan ke dalam *Erlenmeyer* 250 ml. Tambahkan Akuades hingga mencapai 100 ml, kemudian larutkan dengan *hot plate stirer*, kemudian sterilkan dengan *autoclave* 121°C selama 15 menit.

A.2 Pembuatan Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) Agar komersial

- a) timbang media *Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose* (TCBS) Agar sesuai dengan rekomendasi produk yang digunakan.
- b) ambil 100 ml akuades.
- c) campurkan kedua bahan ke dalam *Erlenmeyer* 250 ml, kemudian panaskan dengan pemanas yang dilengkapi pengaduk sampai mendidih.
- d) media yang masih hangat ($\pm 50^{\circ}\text{C}$) dituangkan ke cawan petri steril kemudian dinginkan. Setelah dingin, keringkan air yang merupakan presipitasi dengan menaruhnya dalam inkubator pada suhu 35°C selama ± 20 menit dengan posisi terbalik (bagian *plate* yang ada agarnya menghadap kebawah dalam posisi miring) sehingga terbuka sebagian. Setelah kering ditutup dalam posisi terbalik, simpan dalam *refrigerator*.
- e) setelah 24 jam baru dapat digunakan.

CATATAN penyimpanan pada suhu 4 °C – 6 °C untuk waktu penggunaan paling lama 6 bulan

Komposisi 1 liter media *Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar* (TCBS Agar) terdiri dari :

-	<i>Yeast extract</i>	5 g
-	<i>Protease peptone no.3</i>	10 g
-	<i>Sodium citrate</i>	10 g
-	<i>Sodium thiosulphate</i>	10 g
-	<i>Bacto oxgall</i>	8 g
-	<i>Bacto saccharose</i>	20 g
-	<i>Sodium chloride</i>	10 g
-	<i>Ferric citrate</i>	1 g
-	<i>Bromthymol blue</i>	0,04 g
-	<i>Thymol blue</i>	0,04 g
-	Agar	15 g
-	Akuades	1000 ml.

Lampiran B
(Informatif)
Prosedur kerja

